

ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ НЕВРОБЛАСТОМ

Георги Вълчев^{1,2}

¹Клиника по образна диагностика и лъчелечение, Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Света Марина“ – Варна

²Катедра по образна диагностика и лъчелечение, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

GENETIC MARKERS IN NEUROBLASTOMA

Georgi Valchev^{1,2}

¹Clinic of Diagnostic Imaging and Radiotherapy, St. Marina University Hospital, Varna

²Department of Diagnostic Imaging and Radiotherapy, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Невробластомът е един от често срещаните солидни тумори в педиатрията, с подчертана хетерогенност, касаеща клиничното му протичане – широк диапазон на клинично поведение и своеобразен отговор на приложеното лечение. Такова разнообразие изисква установяването на геномни ориентирани за идентифициране на молекулните механизми, участващи както в иницирането на тумора, така и в злокачествената прогресия. Съвременните биологични и генетични постижения в изучаването на невробластома се явяват важно условие за диагностиката, стратификация на риска и разработването на нови стратегии за лечение. Подобни системи за оценка на риска при пациенти с невробластом разглеждат клинични, хистопатологични и генетични променливи. Към тях могат да бъдат включени класификатори на генната експресия, промяна на броя на копията и соматични мутационни модели, хромозомни аберации. Различни проучвания предлагат нови прогностични маркери, включително генни сигнатури, теломеразна активност и епигенетични маркери. Съвременни изследвания са предоставили допълнителни инструменти за молекулярно характеризирани на кръвни и туморни проби, включително високопроизводителни технологии за анализ на ДНК, микроРНК и други не кодиращи РНК.

Ключови думи: невробластом, хромозомни аберации, MYCN, ALK, Trk, miRNA

ABSTRACT

Neuroblastoma is one of the most frequent solid pediatric tumors. Its clinical course and response to treatment are both markedly heterogenic. Such a varied spectrum demands genomic hallmarks to be established for the sake of identifying the molecular mechanisms, which initiate the tumor and lead to malignant progression. The contemporary biological and genetic revelations regarding neuroblastoma are a crucial part of determining the diagnosis, stratifying the risk, and developing new treatment strategies. Such systems of risk assessment appraise clinical, histopathological, and genetic variables. Among them are classifiers of gene expression, changes in the number of copies and somatic mutation models, chromosomal aberrations. Different studies suggest new prognostic markers, including gene signatures, telomerase activity, as well as epigenetic markers. Contemporary studies have contributed the means of molecular characterization of blood and tumor samples, among which high-yield technologies for analysis of DNA, microRNA, and other non-coding RNAs.

Keywords: neuroblastoma, chromosomal aberrations, MYCN, ALK, Trk, miRNA

Невробластомът (НБЛ) все още е един от най-често срещаните солидни тумори в детството, характеризира се с висока смъртност, като едва 50% от пациентите с метастатично заболяване оцеляват след петата година от поставянето на диагнозата (55,56). Отличителен белег на НБЛ е хетерогенността по отношение на клиничното му протичане, представена от широкия му диапазон на клинично поведение и своеобразен отговор на лечение. Такова разнообразие изисква установяването на геномни ориентири за идентифициране на молекулните механизми, участващи както в иницирането на тумора, така и в злокачествената прогресия (32). Съвременните биологични и генетични постижения в изучаването на НБЛ се явяват важно условие за диагностиката, стратификация на риска и разработването на нови стратегии за лечение. Подобни системи за оценка на риска при пациенти с НБЛ разглеждат клинични, хистопатологични и генетични променливи, като през последните години са предложени и допълнителни прогностични маркери (47).

В широкия смисъл на понятието туморен маркер се включва всеки показател, определен в кръвта, урината или телесните течности, чиято стойност може да се промени при наличието на неопластичен процес в организма. Част от тестовете, използвани при диагностиката и диференциалната диагноза на НБЛ, включват определянето на някои туморни маркери, които според мястото на изолация могат да бъдат серумни, уринни, генетични; по биохимична природа – хормони и техни метаболити (катехоламини и метаболити), ензими (неврон-специфична енолаза, лактатдехидрогеназа), специфични протеини (хромогранин А, неuropeпид Y, феритин, GD2-дисialogанглиозид) (15,44,60). Туморните маркери са основни инструменти за скрининг, диагностициране, стадирание, избор на лечение и проследяване ефекта от приложената терапия при конкретни злокачествени заболявания (49). Предвид технологичния напредък, при изследователските усилия се поставя акцент върху интегрирането на генетичните изменения и прогнозиращите биологични променливи, като крайната цел е модернизирането на подходите за лечение и подобряване преживяемостта на пациентите (37). Генетичните прогностични показатели играят съществена роля в измерване риска на пациентите, а новооткритите биомаркери имат потенциално значение при реализиране на съвременна мултимодална и преди всичко успешна терапия на пациентите (1).

Клиничното поведение на НБЛ е силно повлияно от множество фактори, в това число и от генетичните аномалии, които се срещат в туморите. Както и при други неоплазми, НБЛ се появява в резултат на генетични мутации в критични гени, контролиращи клетъчния растеж, пролиферация и диференциация (51). Повечето мутации са придобити – соматични, неунаследени. НБЛ се характеризира с относително малко количество повтарящи се соматични мутации и при диагностицирането им се категоризира като спорадичен, като се нуждае от поне две отделни мутации, за да се развие. Съвременни проучвания установяват, че мутационното натоварване се увеличава при рецидив. Този факт вероятно е резултат на клоналната еволюция на клетките, носещи мутация по време на първичното лечение (42).

Много по-рядко генетични мутации, увеличаващи риска от невробластом, могат да бъдат унаследени чрез гамета (автосомно доминантно). В този случай туморът се определя като фамилен. Мутираният родителски алел е наличен във всяка клетка на детето, нуждайки се само от единична допълнителна соматична мутация, за да иницира развитието на болестта. Патологични варианти на ALK (anaplastic lymphoma kinase) и PHOX2B (paired like homeobox 2B) гените са най-честите причини за фамилия тип НБЛ (7,20,57).

През последните години профилът на гена експресия на НБЛ е изяснен посредством high-density oligonucleotide microarrays. Първият молекулярен маркер, асоцииран с лоша прогноза при пациенти с локализирана болест, е MYCN амплификацията. Този маркер се открива само при 20% от НБЛ, факт който обуславя необходимостта от допълнителни маркери, за да може да се прецени рискът от рецидив. Всъщност MYCN е една от най-добре характеризирани генетични промени в НБЛ (24,53). Генът на семейството MYCN е изследван в продължение на десетилетия и е известно, че е от решаващо значение за туморогенезата и прогресията на НБЛ (20).

MYCN е клетъчен протоонкоген, кодиращ един от ядрените белтъци, който участва в създаване на транскрипционни регулаторни комплекси със специфични ДНК свързващи свойства. Генът MYCN се разполага на късото рамо на хромозома 2 в локуса 2p24. Известно е, че белтъците от семейство MYC играят централна роля в контрола на клетъчния цикъл и клетъчната пролиферация (22). MYCN изпълнява важна регулаторна функция в процеса на миг-

рация на стволови клетки, модулация на апоптозата, плурипотентността и диференцировката (7,25). Онкогенът MYCN също регулира гените за множествена лекарствена устойчивост MRP1 и MDR1 (51,61). Важно е да се отбележи, че MYCN контролира белтъци, участващи в биогенезата на рибозоми, като по този начин влияе върху белтъчния синтез. Той кодира фактор на транскрипция, който има широко въздействие върху много клетъчни функции, най-важните от които са регулиране на гени, участващи в рибозомната биогенеза и метаболизъм и клетъчна пролиферация. (22,52).

В нормални клетки нивото на белтъка MYCN строго се регулира от фосфатидилинозитол-3-киназата (PI3K), която стабилизира белтъка и регулира включването му в клетъчния цикъл (18).

Амплификацията на ДНК е механизъм, с мощта на който клетките на злокачествените тумори придобиват многочислени копия на части от своя геном, което води до хиперекспресия на клетъчни онкогени, посредством които туморната клетка получава преимущество в растежа и устойчивостта към химиотерапия. Генът MYCN се явява първият онкоген в солидните тумори, за който е била установена амплификация. Генна амплификация на хомоложни секвенции на MYC гена е открита за първи път в клетки от човешки НБЛ от Schwab през 1983 – наречена е MYCN (48). Впоследствие MYCN амплификация бива открита в поне 20% от НБЛ, по-често при пациенти в стадий 4 (24). Сигнификантна връзка между амплификацията на MYCN и по-лоша прогноза е установена при пациенти с локализирани тумори (33). Освен това високорискови пациенти с дисеминиран тумор и MYCN амплификация демонстрират по-бърза прогресия и лоша прогноза в сравнение с пациенти без MYCN (23). Туморогенният потенциал MYCN е свързан именно с процеса на амплификация, тъй като функционални мутации в неговите предели не са установени (25). Амплификацията на MYCN остава един от най-силните предиктори на високорисковото заболяване (3).

Анапластична лимфомна киназа (ALK), известна също като ALK тирозин киназен рецептор, е ензим, който при хората се кодира от ALK гена и се намира в близост до MYCN, на 2p23 човешка хромозома. Генът за ALK принадлежи към семейството на инсулиновите рецептори и представлява сливане между нуклеофозминен и тирозин киназен региони при транслокация t(2;5)(p23;q35) (19). Цитоплазмената експре-

сия на ALK в клетките на НБЛ предполага отделна функция на тази киназа в клетъчната пролиферация и преживяемост. Тези данни допълнително показват, че активираната ALK ще бъде незаменима информация за прогнозата и лечението на НБЛ (41). Амплификацията на ALK локуса и свръхекспресията на ALK протеина се наблюдава в много различни типове ракови клетъчни линии и човешки тумори, включително меланом, невробластом, глиобластом, рабдомиосарком, рак на яйчника, рак на гърдата, астроцитом, сарком на Ewing и ретинобластом (26). При неправилно активиране действа като онкоген и може да трансформира клетки *in vivo* и *in vitro*. ALK е първият установен ген, предразполагащ към НБЛ (36). В клетките на НБЛ ALK е тирозин киназен рецептор, който се активира от точкови мутации и е свръхекспресиран при напреднали форми на НБЛ (5). Доказано е, че точковите ALK мутации се установяват при 7% от спорадичните и 50% от фамилените НБЛ, както и фактът, че играят съществена роля в онкогенезата (9,36). Тези данни допълнително показват, че активираната ALK осигурява незаменима информация за прогнозата и лечението на НБЛ (13).

Trk невротрофиновите рецептори – TrkA/NTRK1, TrkB/NTRK2 и TrkC/NTRK3, са генно семейство тирозин кинази, имащи отношение към развитието на НБЛ (54). Те участват активно в регулиране развитието и диференциацията на централната и периферната нервни системи. Съпътстващите лиганди за тези рецептори са нервнен растежен фактор (NGF), brain-derived neurotropic factor (BDNF) и невротрофин 3 (NT3) (54). Човешкият TrkA ген се разполага на хромозома 1q21 (14). TrkA е рецептор за невронния растежен фактор (NGF) и регулира клетъчните растеж, диференциация и апоптоза при неврони от централната и периферна нервна система. NGF в присъствието на TrkA рецептори индуцира клетъчна диференциация в туморните клетки на НБЛ. Освен това TrkA е описан като ключов фактор в спонтанната туморна регресия на НБЛ (6). TrkA може да бъде свързан с по-добра прогноза при НБЛ, но се инхибира при MYCN амплификация (12). За разлика от това, TrkB се ко-експресира на високи нива с неговия лиганд, BDNF, при клинично и биологично неблагоприятни тумори, особено при тези с MYCN амплификация (54). Хромозомната локализация на TrkB гена е 9q22. Високата експресия на TrkB и неговия лиганд BDNF може да доведе до инвазия, метастази, ангиогенеза и лекарствена резистентност при НБЛ (21). TrkA и TrkC рецепторите също са из-

вестни като рецептори за зависимост, тъй като отсъствието на активиране на лиганда ще генерира апоптотични сигнали (17).

Съвременни изследвания, включващи профилиране на miRNA и lncRNA, сравнителна геномна хибридизация и секвенциониране на цели геноми, позволиха идентифициране на нови прогностични маркери (11). В ролята на допълнителни прогностични маркери могат да влизат туморна геномна пloidност, хромозомни аномалии (включително 1p, 11q делеция, увеличаване дългото рамо на хромозома 17) (46,60). Откриването на структурни (или сегментни) хромозомни аномалии при невробластом е много важно, тъй като тези аберации са свързани с лоша прогноза (29). Промените в две хромозоми, а именно заличаването на късото рамо на хромозома 1 (1p), наблюдавано при около една четвърт от НБЛ, и заличаването на хромозома 11q имат неблагоприятна прогноза (31). Въпреки че 1p делецията е свързана с MYCN амплификация, при 11q не се наблюдава подобна корелация и ефектът се реализира чрез друг механизъм (12).

Делецията на хромозома 1 (1p36) е най-честата структурна хромозомна аберация при НБЛ (около 30%) и се среща у пациенти с лоша прогноза на заболяването. Трябва да се отбележи, че макар 1p делецията да е един от най-честите дефекти, тя играе по-маловажна роля от амплификацията на MYCN (29).

Преди около 30 години за първи път е описано придобиване (gain) на генетичен материал на хромозома 17 (+17q). С появата на нови молекулярни и цитогенетични изследвания е установено, че нарушението се среща у 50% от първичните тумори. Клиничното значение на тази аберация е противоречиво. В първичните НБЛ амплификацията на гена MYCN често се асоциира с придобиване на генетичен материал на хромозома 17 и се явява неблагоприятен прогностичен фактор, тъй като 17q се счита за удобно място за интеграция за амплифицираните последователности на гена MYCN (35).

Делецията на хромозома 11 често се наблюдава у болни с НБЛ с неамплифициран геном MYCN във възрастта от 2,5 до 7 години. Тя е утвърден, независим маркер и е свързана с лоша прогноза у пациенти в клинични стадии 2 и 4S (30). Състоянието на хромозома 11 (11q) играе определена роля в развитието и прогресията на НБЛ и дава възможност за идентифициране на пациенти с повишен риск от рецидиви като цяло и по-специално метастатични рецидиви (50). Делецията на хромозома 11(11q) е една от най-чес-

тите прояви, наблюдавани при развитието на агресивен НБЛ (30). Клинично делецията се свързва с по-висок стадий на заболяването и намалена вероятност за преживяване (34).

Различни проучвания предлагат нови прогностични маркери, включително генни сигнатури, теломеразна активност и епигенетични маркери (58). Няколко изследвания на профилите на генната експресия на голям брой невробластомни генерират така наречените генни сигнатури, които са свързани с благоприятна или неблагоприятна туморна прогресия (58). Въпреки това, за разлика от хромозомните аномалии, генните сигнатури все още не са въведени в широката клинична практика като прогностичен фактор (29).

Транслационни изследвания са предоставили нови инструменти за молекулярно характеризирание на кръвни и туморни проби, включително високопроизводителни технологии за анализ на ДНК, микроРНК и други некодиращи РНК (40).

През последните няколко години напредъкът в следващото поколение секвениране (NGS) и микрочиповите технологии увеличи интереса към некодиращите РНК (ncRNAs), включително малки некодиращи РНК, като miРНК и дълги некодиращи РНК (lncRNAs), предвид тяхната значима роля при специфични заболявания.

Некодиращите РНК (miРНК, lncRNAs, piRNAs) са съществени транскрипционни регулатори на биологията на стволовите клетки (28). Клас биологични молекули, чиято експресия зависи от епигенетичните регулатори, са микроРНК (miRNAs). Като некодиращи РНК молекули, miRNAs са в състояние да контролират експресията на гените на посттранскрипционно ниво. miRNAs се очертават като много важни биомаркери на много видове рак, включително НБЛ. miRNAs регулират активността на невробластомните клетки, подобрявайки техния капацитет за растеж и могат да бъдат използвани като нов прогностичен маркер при НБЛ (10). Всъщност все по-голям брой проучвания показват, че небалансираното изразяване на miRNAs може да предложи алтернативно обяснение за агресивността на НБЛ и да послужи като основа за избор на по-ефективна комбинация от лекарства. Друга група от РНК, дълги некодиращи РНК (lncRNAs), участват в регулирането на MYCN гена и в туморната прогресия на невробластомните клетки и могат да се използват като биомаркери, предсказващи клиничния изход на заболяването (43). По-специално, ролята на lncRNAs в еволюцията и функцията на гено-

ма е новоописан феномен. lncRNAs са некодиращи РНК, които са с дължина >200 нуклеотида и са включени в патологичен и биологичен процес чрез посттранскрипционна регулация на обработка на иРНК (45). През последното десетилетие няколко изследвания установиха, че lncRNA играят важна роля в няколко биологични процеси (59), предвид факта, че са много стабилни и лесно откриваеми в телесните течности (2). lncRNAs имат отношение към туморогенезата, действайки като туморни супресори или онкогени (4,16). Според резултатите на Li et al. дългата некодираща РНК рancEts-1 играе ролята на онкоген в прогресията на НБЛ – нейните стойности са регулирани нагоре при пациенти с НБЛ и са асоциирани с неблагоприятен изход (27).

Теломерите са специализирани структури в края на хромозомите, които участват в репликацията и стабилността на самата хромозома. Те имат важна роля за гарантиране на геномната стабилност и са в състояние на динамично равновесие. Регулирането на дължината на теломерите се контролира отчасти от ензима теломераза (6). Трябва да се отбележи, че експресията на теломеразата често е висока при ракови клетки, но е ниска при повечето нормални клетки (38). При проследяване дължината на теломерите и активността на теломеразата при невробластом се установява, че високите нива на активност на теломеразата обикновено се свързват с по-агресивно поведение на тумора и лоша прогноза. Експресията на теломеразата може да бъде необходима като критичен етап в мултигенетичния процес на туморогенезата. Няколко проучвания определят теломеразната активност като прогностичен фактор при НБЛ (39).

НБЛ вече е един от първите примери за използване на туморни генетични маркери като средство за определяне на поведението на тумора и за подпомагане при избора на оптимално терапевтично поведение (8). През последните години геномните изменения и профилите на генната експресия на тази неоплазма са добре описани. Доказано е, че разнообразните клинични фенотипове се отразяват както от специфични цитогенетични аберации, така и от различни генни експресивни модели. Освен това са описани различни промени в броя на ДНК копията, както и класификатори, базирани на генна експресия, които могат да предскажат изхода при пациенти с НБЛ по-точно от вече установените прогностични променливи (14).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed AA, Zhang L, Reddivalla N, Hetherington M. Neuroblastoma in children: Update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol.* 2017 Apr;34(3):165-185.
2. Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, et al. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2013;33:3185–3193
3. Bagatell R., Cohn S.L. Genetic discoveries and treatment advances in neuroblastoma. *Curr. Opin. Pediatr.* 2016;28:19–25.
4. Barsyte-Lovejoy DI, Lau SK, Boutros PC, Khosravi F, Jurisica I, Andrulis IL, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006;66:5330–5337.
5. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell*, 2014, 26 (5), 682–694.
6. Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11:704–13.
7. Cao Y, Jin Y, Yu J, Wang J, Yan J, Zhao Q. Research progress of neuroblastoma related gene variations. *Oncotarget.* 2017;8(11):18444-18455.
8. Castel V, Grau E, Noguera R, Martínez F. Molecular biology of neuroblastoma. *Clin Transl Oncol.* 2007 Aug;9(8):478-83.
9. Combaret V, Iacono I, Bellini A, Bréjon S, Bernard V, Marabelle A, et al. Detection of tumor ALK status in neuroblastoma patients using peripheral blood. *Cancer Med.* 2015 Apr;4(4):540-50.
10. De Preter K, Mestdagh P, Vermeulen J, Zeka F, Naranjo A, Bray I, et al. miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clin. Cancer Res*, 2011; 17: 7684–7692.
11. Domingo-Fernandez R, Watters K, Piskareva O, Stallings RL, Bray I. The role of genetic

- and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis. *Pediatr Surg Int.* 2013 Feb;29(2):101-19.
12. Dumba M, Jawad N, McHugh K. Neuroblastoma and nephroblastoma: a radiological review. *Cancer Imaging.* 2015, Apr 8;15:5
 13. Esposito MR, Aveic S, Seydel A, Tonini GP. Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. *J Biomed Sci.* 2017 Feb 8;24(1):14
 14. Fischer M, Spitz R, Oberthür A, Westermann F, Berthold F. Risk estimation of neuroblastoma patients using molecular markers. *Klin Padiatr.* 2008 May-Jun;220(3):137-46.
 15. Galli S, Naranjo A, Van Ryn C, Tilan JU, Trinh E, Yang C, et al. Neuropeptide Y as a Biomarker and Therapeutic Target for Neuroblastoma. *Am J Pathol.* 2016 Nov;186(11):3040-3053.
 16. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:667-677.
 17. Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene.* 2010;29:1865-1882.
 18. Gustafson WC, Weiss WA. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene,* 2010;29(9):1249-59.
 19. Hallberg B, Palmer RH. The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol.* 2016 Sep;27 Suppl 3:iii4-iii15.
 20. Higashi M, Sakai K, Fumino S, Aoi S, Furukawa T, Tajiri T. The roles played by the MYCN, Trk, and ALK genes in neuroblastoma and neural development. *Surg Today.* 2019 Sep;49(9):721-727.
 21. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 2002;62:6462-6466.
 22. Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolic Synthetic Lethality, and Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2016;207:73-91.
 23. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med,* 2013 Oct 1;3(10):a014415.
 24. Iehara T, Hosoi H, Akazawa K, Matsumoto Y, Yamamoto K, Suita S, et al. MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening. *Brit J Cancer.* 2006;94(10):1510-1515.
 25. Jeison M, Ash S, Halevy-Berko G, Mardoukh J, Luria D, Avigad S, et al. I. 2p24 Gain region harboring MYCN gene compared with MYCN amplified and non-amplified neuroblastoma. *Am J Pathol,* 2010;176(6):2616-25.
 26. Lamant L, Pulford K, Bischof D, Morris SW, Mason DY, Delsol G, Mariamé B.. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am J Pathol,* 2000; 156:1711-21.
 27. Li D, Wang X, Mei H, Fang E, Ye L, Song H, et al. Long noncoding RNA pancEts-1 promotes neuroblastoma progression through hnRNPK-mediated β -catenin stabilization. *Cancer Res,* 2018 Jan 8. pii: canres.2295.2017.
 28. Louis CU, Shohet JM. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annu Rev Med,* 2015; 66: 49-63.
 29. Luksch R, Castellani M, Collini P, De Bernardi B, Conte M, Gambini C, et al. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours), *Crit Rev Oncol Hematol,* 2016 Nov;107:163-181.
 30. Mandriota SJ, Valentijn LJ, Lesne L, Betts DR, Marino D, Boudal-Khoshbeen M, et al. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) silencing promotes neuroblastoma progression through a MYCN independent mechanism. *Oncotarget,* 2015 Jul 30;6(21):18558-76.
 31. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet,* 2007;369:2106-20.
 32. Matthay KK, George RE, Yu AL. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin Cancer Res,* 2012;18:2740-2753
 33. Matthay, KK, Maris, JM, Schleiermacher, G, Nakagawara, A, Mackall, CL, Diller, L, Weiss WA. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2: 16078.

34. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Lopez G, Maris JM, Ansari M, Gumy-Pause F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. *Mol Cancer*, 2017 Jun 29;16(1):114.
35. Moreau LA, McGrady P, London WB. Does MYCN amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A children's oncology group study. *Clin Cancer Res*, 2006;12(19):5693-7.
36. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008; 455:930-5.
37. Newman EA, Nuchtern JG. Recent biologic and genetic advances in neuroblastoma: Implications for diagnostic, risk stratification, and treatment strategies. *Semin Pediatr Surg*, 2016 Oct;25(5):257-264.
38. Ohali A, Avigad S, Ash S, Goshen Y, Luria D, Feinmesser M, et al. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer*, 2006;107:1391-1399.
39. Onitake Y, Hiyama E, Kamei N, Yamaoka H, Sueda T, Hiyama K. Telomere biology in neuroblastoma: telomere binding proteins and alternative strengthening of telomeres. *J Pediatr Surg*, 2009 Dec;44(12):2258-66.
40. Ora I, Eggert A. Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: impact on future clinical and basic research. *Semin Cancer Bio*, 2011 Oct;21(4):217-28.
41. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol*, 2005 Jul;167(1):213-22.
42. Padovan-Merhar OM, Raman P, Ostrovnaya I, Kalletla K, Rubnitz KR, Sanford EM, et al. Enrichment of Targetable Mutations in the Relapsed Neuroblastoma Genome. *PLoS Genet*, 2016 Dec 20;12(12):e1006501.
43. Pandey GK, Mitra S, Subhash S, Hertwig F, Kanduri M, Mishra K, et al. The Risk-Associated Long Noncoding RNA NBAT-1 Controls Neuroblastoma Progression by Regulating Cell Proliferation and Neuronal Differentiation. *Cancer Cell*, 2014;26:722-37.
44. Pang QM, Li K, Ma L, Sun RP. Clinical research on neuroblastoma based on serum lactate dehydrogenase. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015 Jan-Mar;29(1):131-4.
45. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*. 2011;1:391-407.
46. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet*, 2013 45 (3), 279-284.
47. Rosswog C, Schmidt R, Oberthuer A, Juraeva D, Brors B, Engesser A, et al. Molecular Classification Substitutes for the Prognostic Variables Stage, Age, and MYCN Status in Neuroblastoma Risk Assessment. *Neoplasia*. 2017 Dec;19(12):982-990.
48. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 1983, 305, 245-248.
49. Sebire NJ. Histopathological features of pretreatment neuroblastoma are of limited clinical significance following adjustment for clinical and biological marker status. *Med Hypotheses*, 2006; 66(6):1078-81.
50. Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2006;12(11):3368-7.
51. Sridhar S, Al-Moallem B, Kamal H, Terrile M, Stallings RL. New insights into the genetics of neuroblastoma. *Mol Diagn Ther*, 2013 Apr;17(2):63-9.
52. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov*. 2015 Oct;5(10):1024-39.
53. Suo C, Deng W, Vu TN, Li S, Shi L, Pawitan Y. Accumulation of potential driver genes with genomic alterations predicts survival of high-risk neuroblastoma patients. *Biol Direct*. 2018 Jul 16;13(1):14.
54. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res*, 2009;15:5962-5967.

55. Tonini GP, Romani M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2003 Jul 18;197(1-2):69-73.
56. Tonini GP. Growth, progression and chromosome instability of Neuroblastoma: a new scenario of tumorigenesis? *BMC Cancer.* 2017 Jan 5;17(1):20.
57. Umopathy G, Mendoza-Garcia P, Hallberg B, Palmer RH. Targeting anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *APMIS.* 2019 May;127(5):288-302.
58. Vermeulen J, De Preter K, Mestdagh P, Laureys G, Speleman F, Vandesompele J. Predicting outcomes for children with neuroblastoma. *Discov Med.* 2010 Jul;10(50):29-36.
59. Wang J, Zhang J, Zheng H, Li J, Liu D, Li H, et al. Neutral evolution of 'non-coding' complementary DNAs. *Nature.* 2004;431:1-2.
60. Yang H, Yang M, Guan H, Liu Z, Zhao S, Takeuchi S, Yanagisawa D, Tooyama I. Mitochondrial ferritin in neurodegenerative diseases. *Neurosci Res.* 2013 Sep-Oct;77(1-2):1-7.
61. Zhong ZY, Shi BJ, Zhou H, Wang WB. CD133 expression and MYCN amplification induce chemoresistance and reduce average survival time in pediatric neuroblastoma. *J Int Med Res.* 2018 Mar;46(3):1209-1220.

Адрес за кореспонденция:

д-р Георги Вълчев, д.м.
Клиника по образна диагностика и лъчелечение,
УМБАЛ „Света Марина“ – Варна
бул. „Христо Смирненски“ 1
Варна 9010, България
0885 950 448
e-mail: georgivalchevmd@gmail.com
georgi.valchev@mu-varna.bg